

製品コード MK127

研究用

TAKARA

**Mouse Gla-Osteocalcin
High Sensitive EIA Kit**

説明書

v201606Da

オステオカルシン (Osteocalcin : OC) は、分子中にγ-カルボキシグルタミン酸 (Gla) を 2～3 残基含むアミノ酸 46～50 残基のビタミン K 依存性カルシウム結合性・非コラーゲン性タンパク質として知られています。骨芽細胞でのみ産生されていることから、骨芽細胞特異マーカーであり、特に Gla 型オステオカルシンは、骨形成の指標となっています。

本キットは、マウス Gla 型のオステオカルシン (活性型オステオカルシン) を特異的かつ高感度に測定できるモノクローナル抗体を用いた定量キットです。

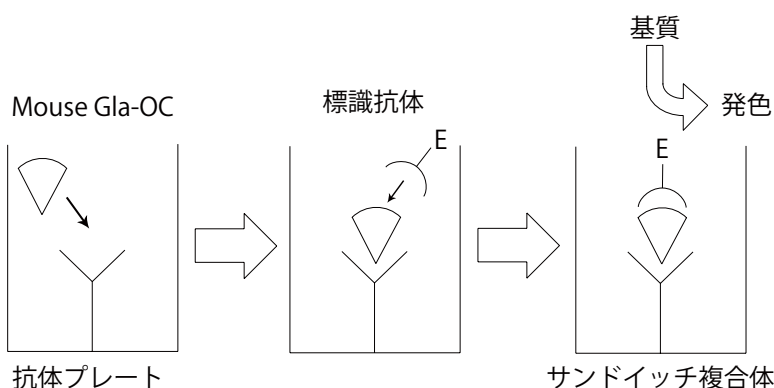
本キットでは、捕捉用抗体 (プレート固定化抗体) としてマウスオステオカルシンの C 末端領域を特異的に認識するラットモノクローナル抗体をプレートに固相化し、Gla 残基を持つオステオカルシン検出用モノクローナル抗体を標識抗体として組み合わせています。マウスのオステオカルシンは、C 末端領域ではヒト・ウシなどの大型動物とは異なる配列を持っているため、C 末端領域にエпитープを持つ抗体で抗原を捕捉することにより、ウシ抗原と交差反応せずにマウスオステオカルシンの測定が可能です。マウス ES や iPS 細胞といった多分化万能細胞からの骨芽系細胞への分化過程を培地に含まれるウシ血清の影響を受けることなしにモニタリングすることができます。

また、本キットは、細胞培養上清だけでなく、マウス血液・体液サンプルの測定も高感度に行えます。8 週齢前後のマウスの場合、10～20 倍希釈での測定が可能で、マウスのような小動物で、採取できる血清がわずかな場合であっても、Gla 型オステオカルシンの濃度を経時的に測定することが可能です。

<各動物オステオカルシンのアミノ酸一次構造>

		10	20	30	40	50					
Human	1	YLYQWL	GAPV	PYPDPLE	PRR	EVGELNP	DCD	ELADHIG	GFQE	AYRRFY	GP-V
Bovine	1	YLDHWL	GAPA	PYPDPLE	PKR	EVGELNP	DCD	ELADHIG	GFQE	AYRRFY	GP-V
Rat	1	YLNNGL	GAPA	PYPDPLE	PHR	EVGELNP	NCD	ELADHIG	GFQD	AYKRIY	GTTV
Mouse	1	YL----	GASV	PSPDPLE	PTR	EQGELNP	PACD	ELSDQY	GLKT	AYKRIY	GITI
Chicken	1	YAQDSG	VAGA	P-PNP	LEAQR	EVGELSP	DCD	ELADQIG	GFQE	AYRRFY	GP-V
Monkey	1	YLYQWL	GAPA	PYPDPLE	PKR	EVGELNP	DCD	ELADHIG	GFQE	AYRRFY	GP-V
Pig	1	YLDHGL	GAPA	PYPDPLE	PRR	EVGELNP	DCD	ELADHIG	GFQE	AYRRFY	GI-A

I. 測定原理



II. キットの内容

(1) Antibody Coated Microtiterplate 抗 Mouse-OC モノクローナル抗体コーティングプレート (96 ウェル：8 ウェル× 12 strips)	1 plate
(2) Antibody-POD Conjugate (凍結乾燥品) ペルオキシダーゼ標識抗 Gla-OC モノクローナル抗体	11 ml 用
(3) Standard (凍結乾燥品) Mouse Gla 型オステオカルシン全長合成ペプチド 16 ng	1 ml 用
(4) Sample Diluent ブロックエース粉末含有 PBS 含防腐剤	11 ml × 2
(5) Substrate Solution (TMBZ) 3,3',5,5' テトラメチルベンジジン溶液	12 ml

III. キット以外に必要な試薬や器具 (主なもの)

Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
洗浄液成分 (10 × PBS ; 50 ml × 5 本、Tween 20 ; 3 ml) と反応停止液 (60 ml) * のセットです。

* : 本品は、1N 硫酸を含まないペルオキシダーゼ反応停止液です。

- 反応停止液として 1N 硫酸も使用できます。
1N 硫酸の取扱いには充分にご注意ください。
<ご注意> 1N 硫酸は腐食性があり、皮膚に接触するとただれ等を起こすことがあります。手や粘膜についた場合は、ただちに多量の水で洗い流し、医師の指示に従ってください。
- ピペット、マイクロピペットおよびチップ
- マイクロプレートリーダー (450 nm 設定で吸光度 3.5 まで測定可能なもの)

IV. 保存 4℃

V. 使用目的

- マウス由来生体サンプル中の Gla 型オステオカルシン量 (Mouse Gla-OC) の測定
 - マウス骨芽細胞上清中の Gla 型オステオカルシン量の測定
- 注：本キットは研究用です。診断目的には使用できません。

VI. 使用方法

1. 検体

- 検体はマウス血清・血漿・腹水・細胞培養上清・細胞抽出液等を用いる。
- 検体は2～10℃に保存し、12時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。
- 希釈が必要な場合は(4) Sample Diluent を用いて希釈する。
- マウス血清検体の場合、8週齢で10～20倍希釈して用いるとよい。
(初回測定の場合は、検体の希釈倍率検討が必要。幼若マウスほど高値が予想される。)
- 本製品はヒト、ウシ(ウシ胎児含む)、ラット、ブタ、ウマ、ニワトリ、モルモット抗原には交差反応しない。
- 本製品は、ウシ抗原には交差反応しないため、ウシ血清含有培地を使用した細胞培養上清も直接用いることができる。
- 本製品は、ウサギ抗原に交差反応が認められる場合があるが、定量性が認められないため、ウサギサンプルの測定には適さない。ウサギサンプルの場合は、Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (製品コード MK111) の使用をお勧めする。

2. 試薬調製

- 抗体プレート (1) Antibody Coated Microtiterplate
使用前に室温に戻してから開封する。
- 標識抗体液
(2) Antibody-POD Conjugate を蒸留水 11 ml で溶解する。
溶解後 4℃ で 1 週間は安定である。それ以上保存する場合には - 20℃ 凍結保存し 1 ヶ月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。
- Mouse Gla-OC 標準液
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、Mouse Gla-OC 標準液 (16.0 ng/ml) を調製する。これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25 ng/ml の各濃度の標準液を調製しておく。0 濃度は (4) Sample Diluent を用いる。
溶解した Mouse Gla-OC 標準液 (16.0 ng/ml) は 4℃ 保存では 1 週間安定で、- 20℃ 保存では 1 ヶ月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。
- 基質液 (5) Substrate Solution (TMBZ)
反応に用いる前に室温にもどし、そのまま使用する。使用前に基質液が濃い青に変色していないか確認する。金属イオンと反応すると呈色するおそれがあるので、特に水道水が混入しないよう注意する。
数回に分けて使用する場合はあらかじめ必要量を取り分けるようにする。
- 反応停止液 (Stop Solution) *
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の Stop Solution をそのまま用いる。
* : 粘度の高い溶液であるため、投入後プレートミキサー等で十分に攪拌してください。
- 洗浄用 0.1% Tween 20 含有 PBS
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の 10 × PBS 1 本 (50 ml) を蒸留水で 500 ml に希釈し、さらに Tween 20 を 500 μl 添加する。十分に混合後、洗浄用バッファー (0.1% Tween 20/PBS) として使用する。

3. 操作法

測定は二重測定で行う。

キット中の各試薬ならびにサンプルは使用前に室温にもどし、泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いる。

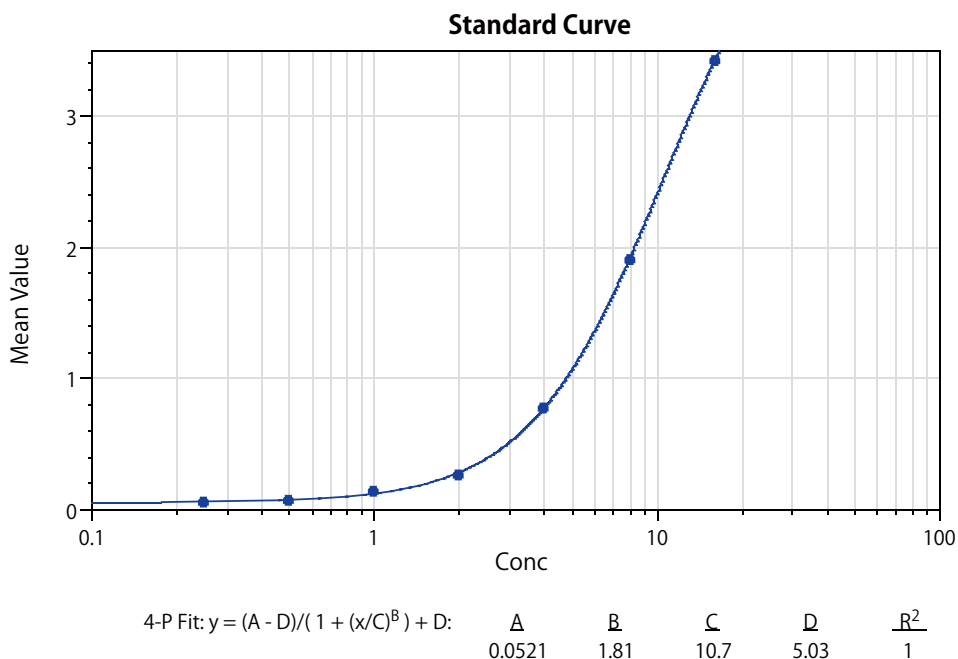
1. 各濃度の Standard および検体を 100 μ l ずつマイクロピペットで各ウェルに 2 連ずつ加え、室温 (20 ~ 30°C) で 1 時間反応させる。サンプルはあらかじめ別の 96 ウェルプレートを利用して用意し、8 連ピペット等ですみやかに (5 分以内) 投入する。プレート内の測定値の信頼を高めるためにも、1 列目と 12 列目とに標準液の希釈系列をおくとよい。37°C の加温は抗原性をそこなう恐れがあるので室温反応にとどめること。(第一反応)
2. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後、標識抗体液を 100 μ l ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 1 時間反応させる。(第二反応)
3. 反応液を捨て、0.1% Tween 20 含有 PBS で 4 回洗浄後、(5) Substrate Solution (TMBZ) を 100 μ l ずつ 8 連ピペットで各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30°C) で 15 分反応させる。(第三反応)
4. 反応停止液を 100 μ l ずつ、(5) Substrate Solution (TMBZ) を入れた順番に各ウェルに加え、反応を停止させた後よく混和する。
5. 蒸留水を対照としてゼロ調整し、波長 450 nm で吸光度を測定する。発色は反応停止後 1 時間までは安定である。
6. グラフ用紙の横軸に各 Standard の濃度を、縦軸に対応する吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度から対応する Mouse Gla-OC 濃度を読み取る。

VII. 性能

1. 標準曲線 (Mouse Gla-Osteocalcin EIA Kit)

下記の標準曲線は代表的な一例である。正確な結果を得るためには、測定ごとに標準曲線を作成してください。

最少検出感度：0.5 ng/ml



Mouse Gla-OC 濃度 (ng/ml)	16.0	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	0.25	0
Absorbance 450nm	3.417	1.906	0.777	0.268	0.133	0.074	0.056	0.047

(発色時間 15 分)

2. 再現性

<同時再現性試験>

Mouse Gla-Osteocalcin 含有マウス骨抽出物で作製した3種類の濃度コントロールを用いて再現性試験を実施した。

検体 (n=8)	平均値 (ng/ml)	SD	CV (%)
コントロール A	8.136	0.429	5.3
コントロール B	3.856	0.066	1.8
コントロール C	1.732	0.033	1.9

<日差再現性試験>

3日間にわたり3種類の濃度コントロールの定量を行い、再現性試験を実施した。

検体 (n=3)	平均値 (ng/ml)	SD	CV (%)
コントロール D	8.215	1.39	4.6
コントロール E	3.940	0.11	2.7
コントロール F	1.768	0.06	3.5

<添加回収>

種々の濃度のサンプルを等量ずつ混合し、予想される理論値と実測値から回収率を調べた。平均的な添加回収率は、103%であった。

サンプル A	サンプル B	理論値 (A+B) /2	実測値	添加回収率 (%)
8.62	15.82	12.22	13.01	106.4
8.62	8.35	8.49	9.04	106.6
8.62	4.46	6.54	6.70	102.4
8.62	2.12	5.37	5.55	103.3
8.62	1.10	4.86	4.90	100.7
4.07	15.82	9.95	10.77	108.3
4.07	8.35	6.21	6.70	107.9
4.07	4.46	4.26	4.17	97.7
4.07	2.12	3.09	2.95	95.4
4.07	1.10	2.58	2.64	102.1
1.83	15.82	8.83	9.71	110.0
1.83	8.35	5.09	5.12	100.6
1.83	4.46	3.15	3.19	101.4
1.83	2.12	1.98	2.07	105.0
1.83	1.10	1.47	1.46	99.4
1.83	0.58	1.21	1.22	101.5

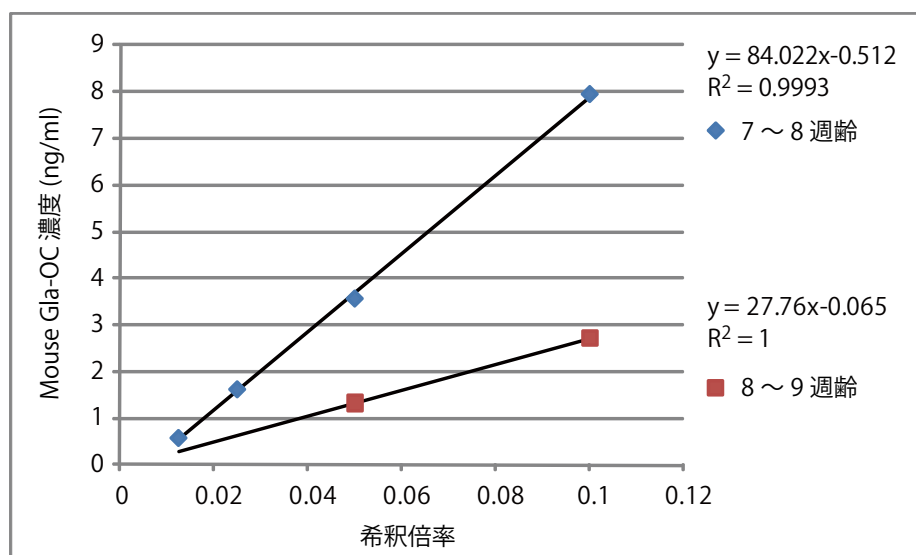
単位：ng/ml

3. マウス血清サンプルの希釈直線性

8～9週齢のICRマウス血清（15匹分のプール血清）の測定例である。検量線の信頼範囲には幼若マウスの場合で、10倍もしくは20倍希釈の測定、高週齢マウスの場合は、原液から5倍の希釈の測定が望ましい。

希釈倍率	7～8週齢	8～9週齢	高週齢
×10	7.939	2.711	0.078
×20	3.564	1.323	感度以下
×40	1.622	感度以下	感度以下
×80	0.581	—	—

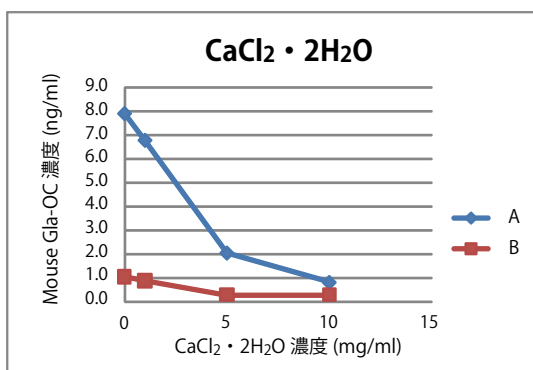
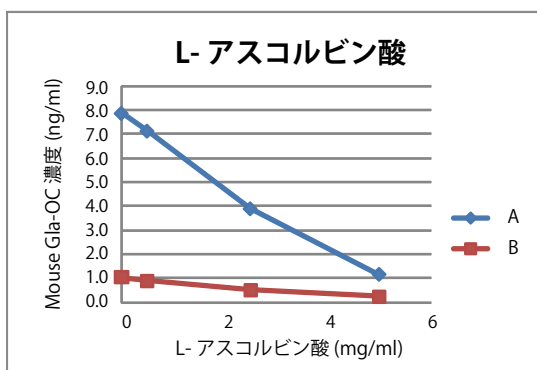
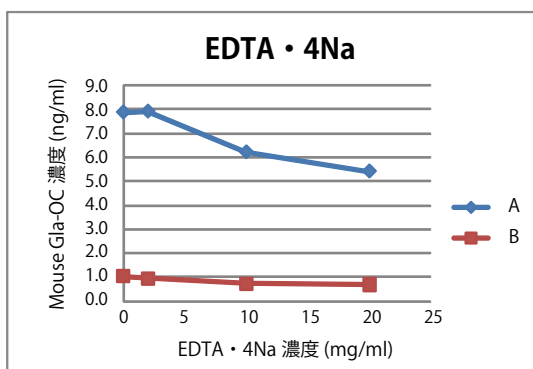
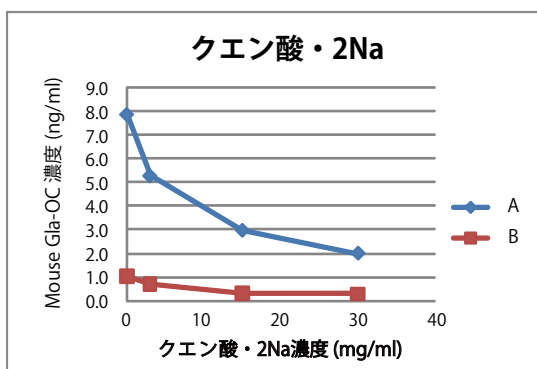
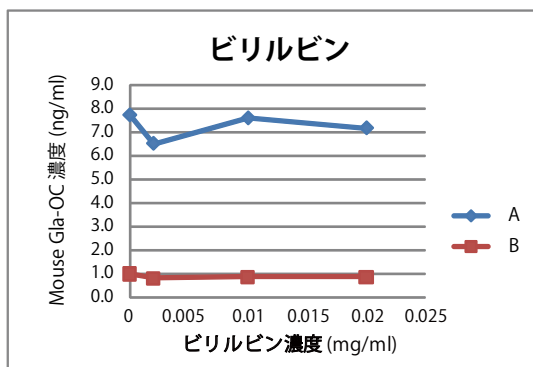
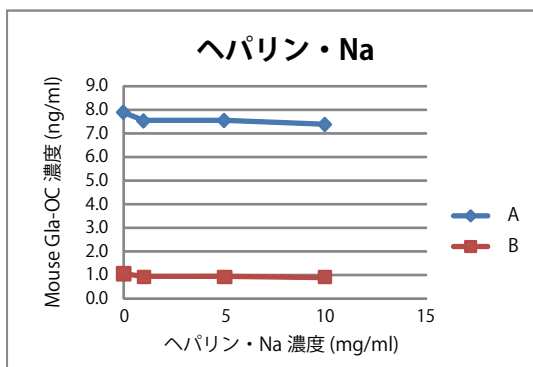
単位：ng/ml



VIII. 測定に関する基本資料

1. 共存物質の影響

2種類の濃度のオステオカルシン標準液 (A, B) 9容量に対し、供試物質 1容量を加え、反応系に与える影響をみた。グラフ内の横軸は供試物質終濃度を表している。(単位: ng/ml)



2. マウス培養細胞上清の測定例

マウス頭蓋骨から樹立された骨芽様細胞 MC3T3E1 の培養において、産生される Gla 型オステオカルシンを定量モニタリングした。

培養条件： DMEM、10% FCS、ストレプトマイシン／ペニシリン含有
細胞数： 播種時 1×10^6 細胞 / 10 cm シャーレ 1 枚
70% 飽和培養から 100% 飽和へ移行させる。
使用培地量： 30 ml / 10 cm シャーレ
測定条件： 0.5 ml ずつ培養上清を経日的サンプリング、原液で測定

培養日数 (day)	Gla-OC 濃度 (ng/ml)
Blank (培地)	0.000
1	0.559
5	0.515
10	0.863
20	3.500
22	4.364
24	3.856

<結果>

本実験では、細胞に対する培地を潤沢とし、途中の培地交換を実施せずにモニタリングを続けた。24 日以降については、培地交換を実施したため、データ取得していない。

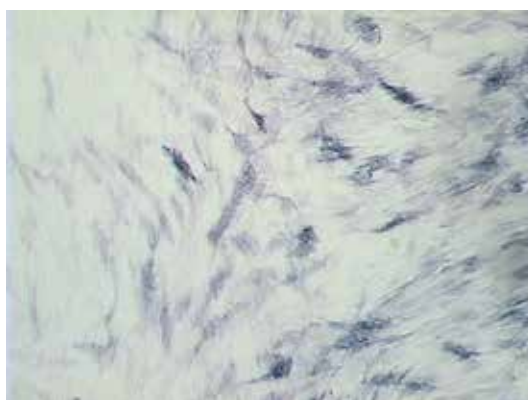
培養上清中の Gla 型オステオカルシン産生が確認できた。

培養開始日および 30 日目にアルカリ性ホスファターゼ染色を行った。

アルカリ性ホスファターゼ染色には、TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300) を用いた。



培養 0 日目



培養 30 日目

IX. 関連製品

Mouse Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK129)
Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA Kit (製品コード MK111)
Human Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK128)
Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK126)
Rat Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (製品コード MK146)
Pig Gla-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK139)
Pig Glu-Osteocalcin EIA Kit (製品コード MK149)
TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300)
TRACP & ALP Assay Kit (製品コード MK301)
Anti-Mouse Osteocalcin, Monoclonal (Clone R21C-01A) (製品コード M188)
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)

X. 使用上の注意

1. ロット番号の異なるキットの試薬を混ぜて使用しないでください。
2. 保存もしくは反応中に試薬を強い光に当てないでください。
3. (5) Substrate Solution (TMBZ) および Stop Solution に用いるピペット等は金属が使われていないものを用いてください。
4. (5) Substrate Solution (TMBZ) や Stop Solution は手や粘膜につかないようご注意ください。
5. 着色した (5) Substrate Solution (TMBZ) は使用しないでください。
6. 各反応は時間、温度の影響を受けるので測定ごとに標準曲線を作成してください。
7. 血液検体の取扱いには充分注意してください。

XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

Takara テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社